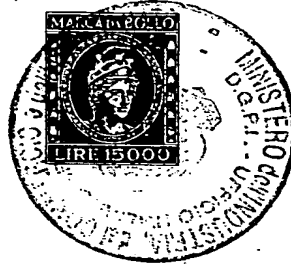




08/817595

**MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO**  
DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE  
UFFICIO CENTRALE BREVETTI



REC'D 30 MAR 1995

WIPO PCT

**Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per .....**

**N. MI94.A.001713**

**INV. IND.**

**PRIORITY DOCUMENT**

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

Roma, il 11 GEN. 1995

**IL DIRETTORE DELLA  
DIVISIONE  
IL PRIMO DIRIGENTE  
(Dr. Giuseppe Petrucci)**

## A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione TURIANO ANGELAResidenza MILANOcodice 20122

2) Denominazione

Residenza

codice

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.C.B.

cognome nome GISLON GABRIELE

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza MARIETTI e GISLON S.r.l.via LARGAn. 16città MILANOcap 20122(prov) MI

## C. DOMICILIO ELETTIVO DESTINATARIO

via

n.

città

cap

(prov)

## D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci)

gruppo/sottogruppo

COMPOSIZIONE FARMACEUTICA PER LA TERAPIA TUMORALE CONTENENTE XENOANTIGENANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

## E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) TURIANO ANGELA

3)

2)

4)

## F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato  
S/R

1)

2)

## SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N° Protocollo

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI

## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) ☒ PROVn. pag. 14

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

Doc. 2) ☒ PROVn. tav. 04

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

Doc. 3) ☒ RIS

lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale

Doc. 4) ☒ RIS

designazione inventore

Doc. 5) ☒ RIS

documenti di priorità con traduzione in italiano

Doc. 6) ☒ RIS

autorizzazione o atto di cessione

Doc. 7) ☒

nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale lire trecento sessantacinquemila

obbligatorio

9) marche da bollo per attestato di brevetto di lire

obbligatorio

COMPILATO IL 04/08/1994

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (I)

GISLON GABRIELECONTINUA SI/NO ☒DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO ☒UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI MILANOcodice 15

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI94 A 001713

Reg.A

L'anno millenovecento

NOVANTAQUATTRO

il giorno

CINQUE

del mese di

AGOSTOil(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraportato.

## I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

timbro  
dell'Ufficio

L'UFFICIALE ROGANTE

CORTONESI MAURIZIO

MOU  
Ing. G. Manetti (n. iscr. 175) <sup>175</sup>  
Dr. G. Gialoni (n. iscr. 513) <sup>513</sup>



### RIASSUNTO

Si descrivono xenoantigeni scelti fra le molecole di istocompatibilità ottenibili per estrazione da omogenati di tessuti o cellule con detergente Nonidet P40 o con acido  $\text{HClO}_4$  1N, per l'uso come medicamento per la stimolazione del sistema immunitario dell'uomo e dei mammiferi, ed in particolare per la terapia tumorale. (fig. 2)

Descrizione dell'invenzione che ha per titolo :

"COMPOSIZIONE FARMACEUTICA PER LA TERAPIA TUMORALE  
CONTENENTE XENOANTIGENI"

a nome : TURIANO Angela, residente in Milano, di  
nazionalità italiana,

Inventore : Angela TURIANO

.\*.\*.\*.\*.

La presente invenzione concerne una composizione farmaceutica contenente xenoantigeni, utile per la stimolazione del sistema immunitario, in particolare per la terapia tumorale, vale a dire per il trattamento dei tumori nell'uomo e nei mammiferi in generale.

Più in particolare, la presente invenzione concerne una composizione farmaceutica contenente come principio attivo antigeni MHC estratti da tessuti animali ed aventi peso molecolare compreso tra 10.000 e 50.000 dalton circa.

Nel trattamento delle patologie tumorali, a fronte dei risultati finora ottenuti con i farmaci di sintesi e le terapie chimiche e fisiche finora utilizzate si è pensato di sviluppare sistemi per stimolare la risposta immunitaria dell'organismo contro la proliferazione di cellule cancerose.

Un fattore chiamato AF2, ottenuto da estratti di agnelli ed embrioni di pecora è stato utilizzato nella terapia di supporto antitumorale come analgesico ed antiemetico

biologico (Schweiz-Rundsch-Med. Prax. 1990, 79, (16): 498-502).

E' anche noto un polipeptide antitumorale ottenuto da cellule umane macrofagi-like ed avente peso molecolare di 47.010.

Nella domanda di brevetto italiana n. MI93A001369, depositata nel nome della presente richiedente, si descrive come antigeni di istocompatibilità e/o ubiquitina o molecole associate, somministrate a portatori di neoplasie suscitino una risposta immunitaria cellulo mediata e/o umorale che può produrre inibizione della crescita delle cellule tumorali ed una regressione della malattia neoplastica.

E' noto che gli antigeni di istocompatibilità, presenti in modo ubiquitario sulle cellule, svolgono una funzione di vitale importanza per la regolazione del sistema immunitario, intervenendo nel meccanismo che consente alle cellule dell'immunità di differenziare antigeni estranei (non self) dagli antigeni propri di un individuo (self).

Gli antigeni e più in genere le molecole di istocompatibilità sono codificati da un gruppo di geni localizzati in un'ampia regione di un singolo cromosoma.

Si riconoscono tre classi principali di geni : quelli di classe I, che codificano per gli antigeni e le molecole responsabili del rigetto di trapianti e della distruzione

delle cellule autologhe alterate; quelli di classe II, che codificano per le strutture di superficie che intervengono nella cooperazione tra linfociti B, T e macrofagi, e quelli di classe III, che codificano per alcune frazioni del "sistema di complemento" e la sintesi di una proteina serica (proteina Ss).

Gli antigeni di istocompatibilità di classe I sono costituiti da due catene polipeptidiche legate non covalentemente. La catena più grande, responsabile della allogenicità, ha un peso molecolare di circa 43.000; quella più piccola, identificata con la  $\beta$ -2 microglobulina, ha un peso molecolare di circa 13.000, non è codificata dal sistema maggiore di istocompatibilità ed è sempre uguale per ogni molecola di classe I.

Le due catene polipeptidiche sono covalentemente associate ad una catena invariabile di circa 33.000 daltons.

Gli antigeni di istocompatibilità di classe II sono caratterizzati da due catene glicoproteiche, una di peso molecolare 34.000 detta alfa, ed una di peso molecolare 29.000 detta beta.

Gli antigeni istocompatibili vengono solitamente isolati dopo che le cellule sono state distrutte mediante sonicazione, trattamento con azoto o congelamento/scongelo. Una volta preparate le membrane, le molecole di istocompatibilità vengono



estratte mediante una varietà di detergenti o mediante proteolisi. Sono inoltre stati impiegati per l'estrazione di antigeni di istocompatibilità da cellule vitali, ma non da membrane cellulari, sali ad alta forza ionica. La maggior quantità di antigeni di istocompatibilità si ottiene costantemente con i detergenti, come ad esempio il Nonidet P40 (si veda ad es. A. Dautigny et al. *Biochimica et Biophysica Acta*, 298 (1973) 783-789). In questo caso è possibile separare le varie specificità MHC per elettroforesi a gradiente di pH.

Si è ora scoperto che la risposta immunitaria dell'organismo affetto da neoplasia migliora notevolmente se si somministrano antigeni MHC estratti da tessuti animali di specie diversa (xenoantigeni).

Tale effetto è ancora più marcato e duraturo se nella somministrazione si alternano xenoantigeni di diversa provenienza.

Sono pertanto un oggetto della presente invenzione composizioni farmaceutiche per la terapia antitumorale, caratterizzate dal fatto di comprendere come principio attivo molecole di istocompatibilità estratte da tessuti animali.

Con molecole di istocompatibilità si vogliono qui indicare gli antigeni di istocompatibilità e tutte le molecole che vengono codificate in modo analogo agli antigeni

istocompatibili dai corrispondenti loci genetici MHC, nonché le molecole loro associate ottenute per estrazione. Un ulteriore oggetto dell'invenzione è una composizione farmaceutica del tipo sopra descritto, caratterizzata dal fatto di presentare confezioni separate di estratti di tessuti animali contenenti essenzialmente molecole di istocompatibilità di diversa provenienza, per la somministrazione successiva di dette molecole.

Con molecole di istocompatibilità di provenienza diversa si vuole qui indicare molecole di istocompatibilità ottenute da organismi diversi o da specie diverse, o comunque provenienti da lotti di lavorazione differenti tra loro.

Come sopra accennato, le molecole di istocompatibilità utili per l'invenzione sono generalmente ottenute per estrazione da tessuti animali, insieme ad altre molecole loro associate. Gli antigeni e le molecole di istocompatibilità costituiscono il principio attivo vero e proprio, mentre le molecole loro associate sono estratte insieme agli antigeni e presumibilmente fungono da carrier per le molecole di istocompatibilità.

Gli antigeni e le molecole di istocompatibilità utilizzati nella presente invenzione sono stati preparati da tessuti di fegato di mammiferi, generalmente fegato di vitello o di capra omogeneizzato.



Esempio I - Estrazione con acidi ( $\text{HClO}_4$  1N)

5g di omogenato di fegato di vitello vengono dispersi in 10ml di acqua distillata. Si aggiungono quindi 10 ml di  $\text{HClO}_4$  2N gocciolando in 20 minuti, sotto agitazione e a  $4^\circ\text{C}$ . Si continua l'agitazione per 30 minuti e si centrifuga a  $10.000 \times g \times 20$  minuti a  $4^\circ\text{C}$ . Si dializza contro acqua corrente e poi contro acqua distillata per tutta la notte. Si concentra per un fattore 5 con Amicon PM 10 e si aggiunge il triplo in volume di  $\text{KCl}$  4 M in tampone fosfato 0.05 M a pH 7.5. Si tiene sotto agitazione a  $4^\circ\text{C}$  per 24 ore e quindi si centrifuga a  $100.00 \times g \times 1$  ora a  $4^\circ\text{C}$ . Il surnatante viene dializzato contro PBS e nuovamente centrifugato. L'estratto viene infine concentrato per ultrafiltrazione su membrane con cut-off 10.000 fino ad una concentrazione proteica di 1 mg/ml.

Esempio II - Estrazione con detergenti (PBS+Nonidet P40).

1 g di omogenato di fegato di vitello è stato sospeso in PBS 0.14 M con pH 7.2, ed in presenza di Nonidet P40 (BDH) allo 0,5% portando il tutto ad un volume finale di 16,5 ml. La sospensione è stata tenuta sotto agitazione a  $25^\circ\text{C}$  per 45 minuti e quindi centrifugata a  $100.000 \times g \times 1$  ora. Il surnatante è stato dializzato su Diaflo-membrane, PM 10 (Amicon) per eliminare il detergente, e si è quindi proceduto all'ultrafiltrazione con cut-off 10.000 ed alla concentrazione dell'estratto fino ad un contenuto proteico

di 1 mg/ml.

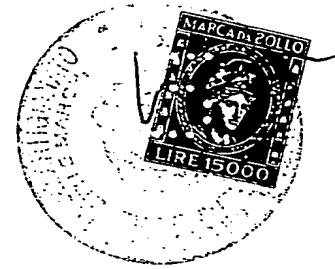
Con il procedimento degli esempi I e II si ottengono antigeni di istocompatibilità e molecole loro associate con alto peso molecolare (da 10.000 a 50.000 circa)

L'estratto di fegato così ottenuto, denominato AIM-3, è stato utilizzato per prove in vitro ed in vivo.

Per le prove in vivo sono state utilizzate due vie di somministrazione : sottocutanea o locale. Generalmente, la somministrazione giornaliera a pazienti umani di 4 ml del preparato secondo l'esempio II porta a risultati positivi in 4 settimane circa. La neutralizzazione delle proteine MHC da parte degli anticorpi indotti contro le stesse molecole MHC viene evitata variando ogni settimana l'origine dell'estratto, vale a dire utilizzando estratti di lotti diversi ottenuti da tessuti della stessa specie o di specie differenti.

Possono comunque essere usate diverse vie di somministrazione, come ad esempio parenterale, per aerosol eccetera. La composizione farmaceutica conterrà di conseguenza veicolanti ed inerti farmaceuticamente accettabili e scelti tra quelli noti nella tecnica, in funzione della via di somministrazione prescelta.

L'invenzione verrà ora descritta più in dettaglio con riferimento agli esempi ed ai disegni acclusi, dove le figure da 1 a 6 sono diagrammi che indicano l'evoluzione



del numero di cellule cancerose nel tempo a seconda del trattamento effettuato.

#### Sperimentazione in vitro

##### Esempio A

Cellule Molt<sub>4</sub> sono state inoculate con l'estratto dell'esempio I. Le cellule inoculate hanno prodotto TNF nel surnatante solo dopo 24 h dall'inoculazione, con concentrazioni nettamente superiori a quelle rivelate nelle cellule non trattate (1000 pg/ml contro 300 pg/ml).

#### Sperimentazione in vivo

Sono stati impiegati ratti di ceppo Fischer inbred, del peso di 150-175 g. Il tumore è stato indotto mediante inoculo di cellule AH-130 Yoshida, alla dose di circa 250.000 cellule tumorali, in cavità pleurica; questa dose ha permesso di osservare la crescita del tumore per circa 18 giorni prima della morte dell'animale.

E' quindi stato fatto seguire il trattamento con la composizione secondo l'invenzione, come ottenuta secondo l'esempio I, in dosi da 0,025 mg/kg/giorno in pleura, in peritoneo o sottocute secondo i seguenti esempi.

##### Esempio B

Alcuni dei ratti inoculati sono stati trattati con la dose sopra citata dell'estratto di cui all'esempio I (ma ottenuto da fegato di capra) in pleura (▲), peritoneo (○) o sottocute (△) dal 4° al 8° giorno e quindi dal 12° al

16° giorno successivo all'iniezione di cellule.

I dati (media  $\pm$  SEM di 7 esperimenti) dimostrano che a partire dal giorno 8, nei ratti trattati il numero di cellule tumorali intrapleurale era significativamente minore che nei controlli (●) trattati con soluzione fisiologica.

#### Esempio C

In questo caso si è somministrato l'estratto dell'esempio I con trattamento giornaliero dal giorno 4 al giorno 15. Dal grafico di fig. 2 è evidente la riduzione di crescita delle cellule tumorali nei ratti trattati (○) rispetto ai controlli (●).

#### Esempio D

Sono stati preparati due estratti secondo l'esempio I da due lotti differenti di omogenato di fegato di vitello. Il primo lotto è stato somministrato ai ratti inoculati dal giorno 6 al giorno 14. Il secondo lotto è stato somministrato dal giorno 15 al giorno 21. I risultati, mostrati nel diagramma di fig. 3, evidenziano come la tendenza alla proliferazione delle cellule tumorali diminuisca quando si varia l'estratto. I controlli (curva superiore) sono stati trattati con soluzione fisiologica come negli esempi precedenti.

#### Esempio E

In questo esperimento si è somministrato un estratto come

all'esempio I, ottenuto da fegato di capra dal giorno 5 al giorno 10 e lo stesso tipo di estratto, ma ottenuto da fegato di vitello, dal giorno 11 al giorno 16. I risultati (fig. 4) mostrano nei ratti trattati (○) una notevole riduzione della crescita cellulare a partire dal giorno 8 rispetto ai controlli (●) ed anche rispetto alla crescita verificatasi nei ratti trattati di cui agli esempi precedenti.

#### Esempio F

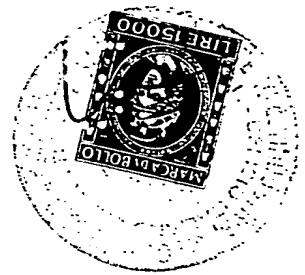
In questo caso si sono utilizzati ratti NIH-RNU<sup>+</sup> (fig. 5) e ratti NIH-RNU<sup>-</sup> (fig. 6) cioè con e senza timo, ai quali è stato somministrato l'estratto di cui all'esempio II.

Il grafico di fig. 5 evidenzia il comportamento dei ratti con timo trattati (curva A) e dei corrispondenti controlli (curva B). In fig. 6 si dimostra come il trattamento con le molecole MHC dell'estratto secondo l'invenzione non determini una riduzione della proliferazione tumorale fino al giorno 8, in quanto i ratti RNU<sup>-</sup> non possiedono i linfociti T. A partire dal giorno 9 nei ratti trattati (curva C) si ha una riduzione della crescita delle cellule neoplastiche determinata dalla proliferazione di linfociti B stimolati dal trattamento contro le cellule tumorali e dalla stimolazione di altre cellule effettrici.

Malgrado non si voglia qui dare una completa spiegazione del meccanismo di azione del principio attivo secondo la

presente invenzione, si ritiene che esso sia basato sulla presenza di antigeni e molecole MHC, che sono altamente immunogeni.

L'efficacia di tali molecole è il risultato dell'attivazione da parte delle proteine MHC dei linfociti anergici dei portatori di tumore. Le cellule tumorali normalmente eludono l'attacco dei linfociti T perché questi ultimi pur avendo riconosciuto gli antigeni tumorali non ricevono un secondo segnale in quanto le cellule tumorali sono prive di adeguate molecole costimolatrici. Le molecole codificate da un MHC estraneo si legano ai recettori dei linfociti T, con un meccanismo analogo a quello che si verifica nel rigetto di trapianti, e mettono in moto una serie di eventi biochimici che portano alla distruzione delle cellule tumorali. Nei ratti privi di linfociti T, ai quali sono state inoculate cellule tumorali, le proteine MHC completano la stimolazione dei linfociti B che, pur avendo riconosciuto l'antigene tumorale, in assenza dei linfociti T helper resterebbero inattivi.



#### RIVENDICAZIONI

1. Composizione farmaceutica per la stimolazione della risposta immunitaria di un organismo, caratterizzata dal fatto di comprendere come principio attivo molecole di istocompatibilità MHC estratte da tessuti animali...
2. Composizione secondo la rivendicazione 1, per il trattamento di patologie tumorali.
3. Composizione farmaceutica secondo una delle rivendicazioni precedenti, caratterizzata dal fatto di comprendere molecole di istocompatibilità di origine diversa, in confezioni separate, per la somministrazione successiva di dette molecole di istocompatibilità.
4. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 3, caratterizzata dal fatto che dette molecole di istocompatibilità sono di specie diverse.
5. Composizione farmaceutica secondo una delle rivendicazioni precedenti, caratterizzata dal fatto che dette molecole MHC sono ottenute come estratto da tessuti animali con detergenti, e presentano peso molecolare compreso nell'intervallo tra 10.000 e 50.000 daltons circa.
6. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 5, caratterizzata dal fatto che detti tessuti sono fegato di capra, vitello o maiale.
7. Molecole di istocompatibilità per l'uso come

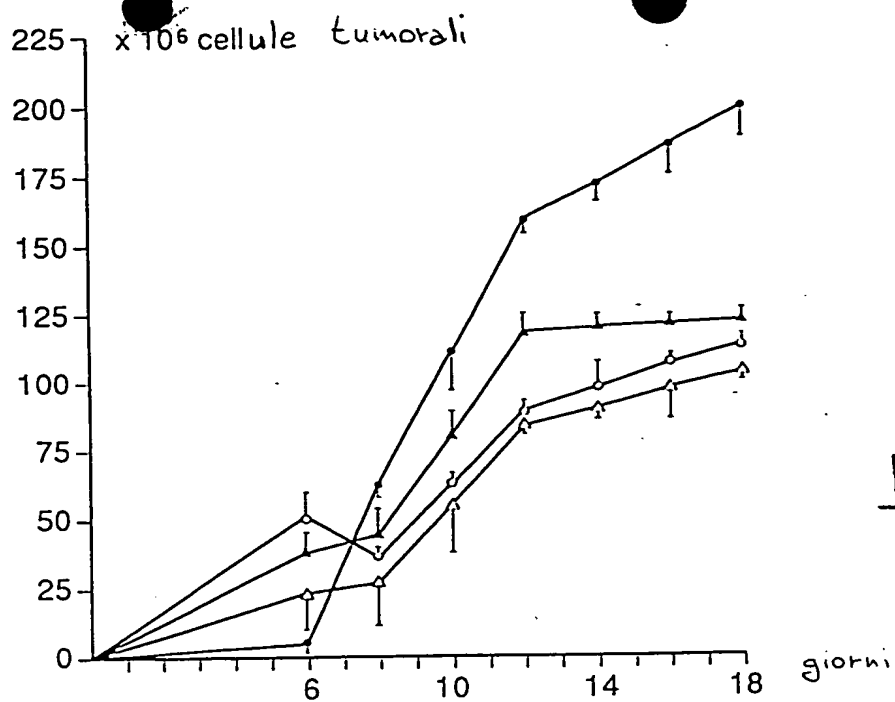
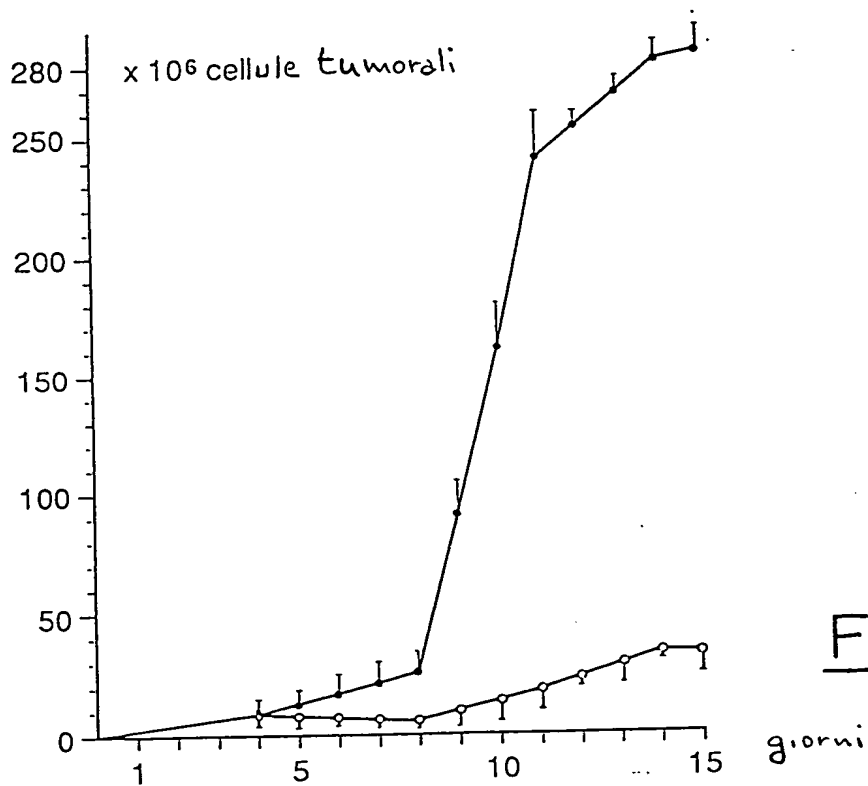
medicamento nella stimolazione del sistema immunitario e nella terapia tumorale.

8. Molecole di istocompatibilità di origine diversa, per l'uso in somministrazione sequenziale come medicamento nella terapia tumorale.

9. Uso di molecole di istocompatibilità per la preparazione di una composizione farmaceutica per la stimolazione del sistema immunitario e per il trattamento di patologie tumorali.

10. Uso secondo la rivendicazione 9, in cui dette molecole di istocompatibilità sono di origine diversa.



Fig. 1Fig. 2

Ing. G. Marietti (n. iscr. 175)  
 Dr. G. Gistoni (n. iscr. 513)

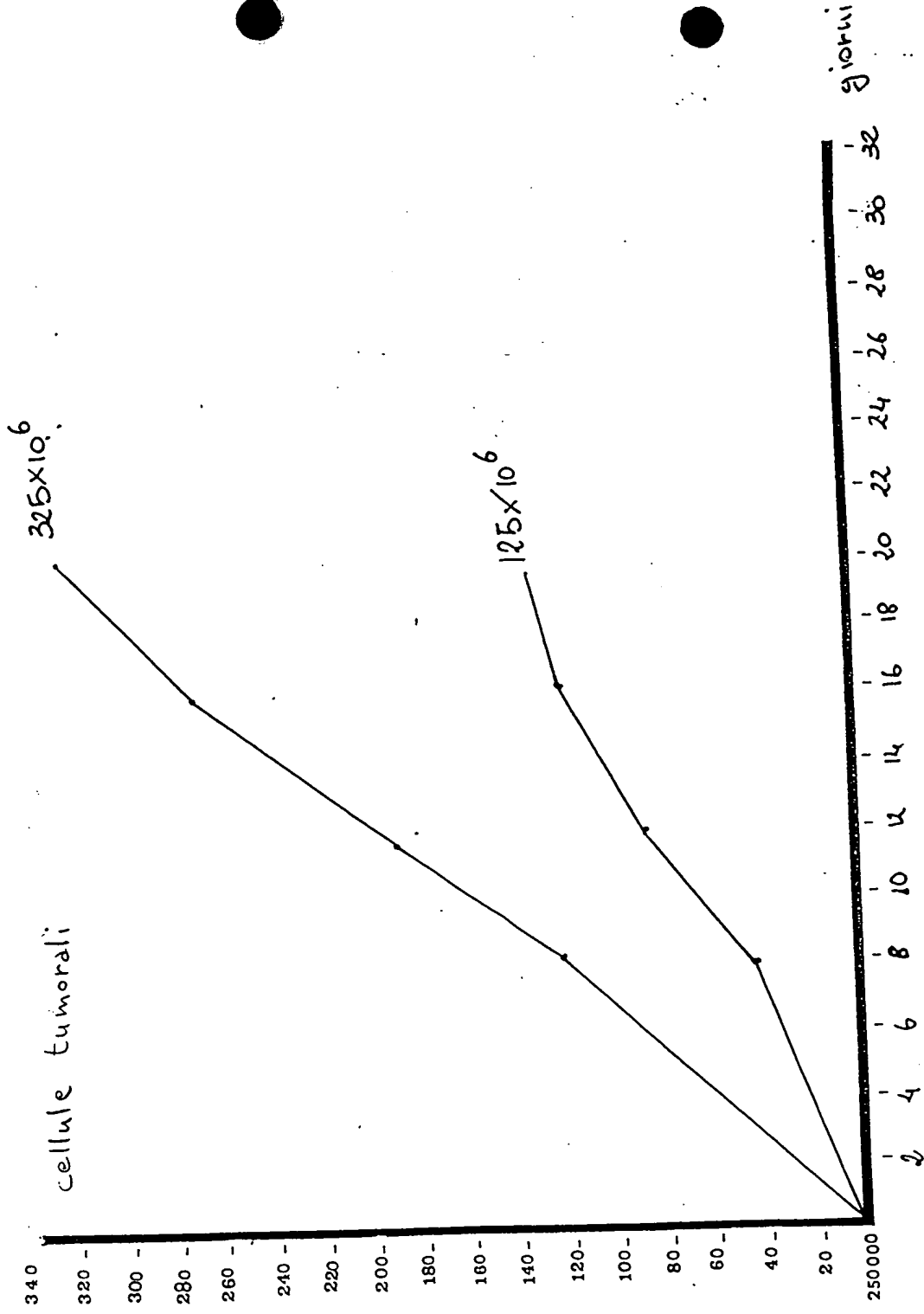
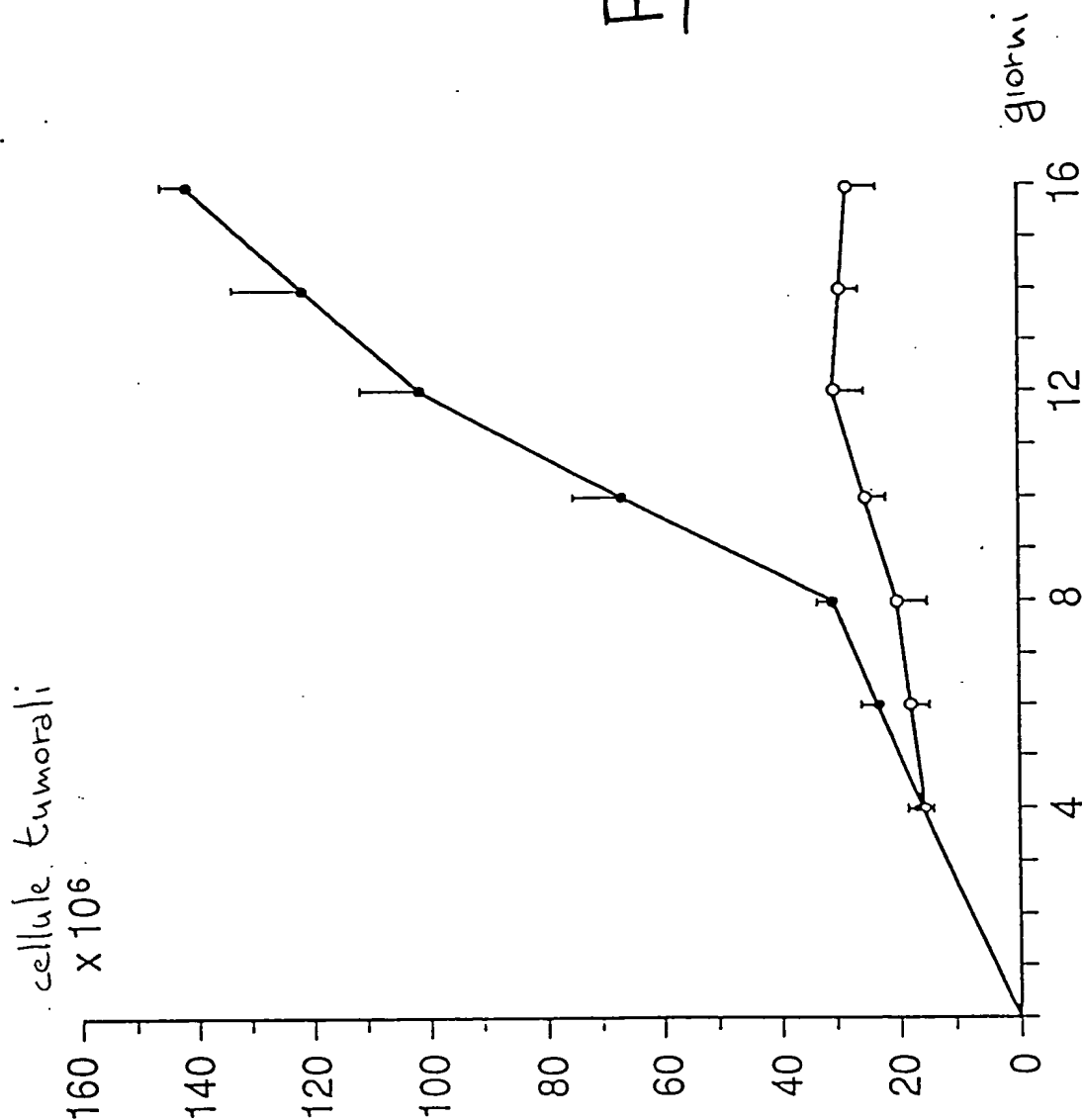


Fig. 3

Ing. G. Marietti (n. iscr. 175)  
Dr. G. Gislone (n. iscr. 513)



Fig. 4



Ing. G. Mariotti (n. iscr. 176)  
Dr. G. Gislon (n. iscr. 513)

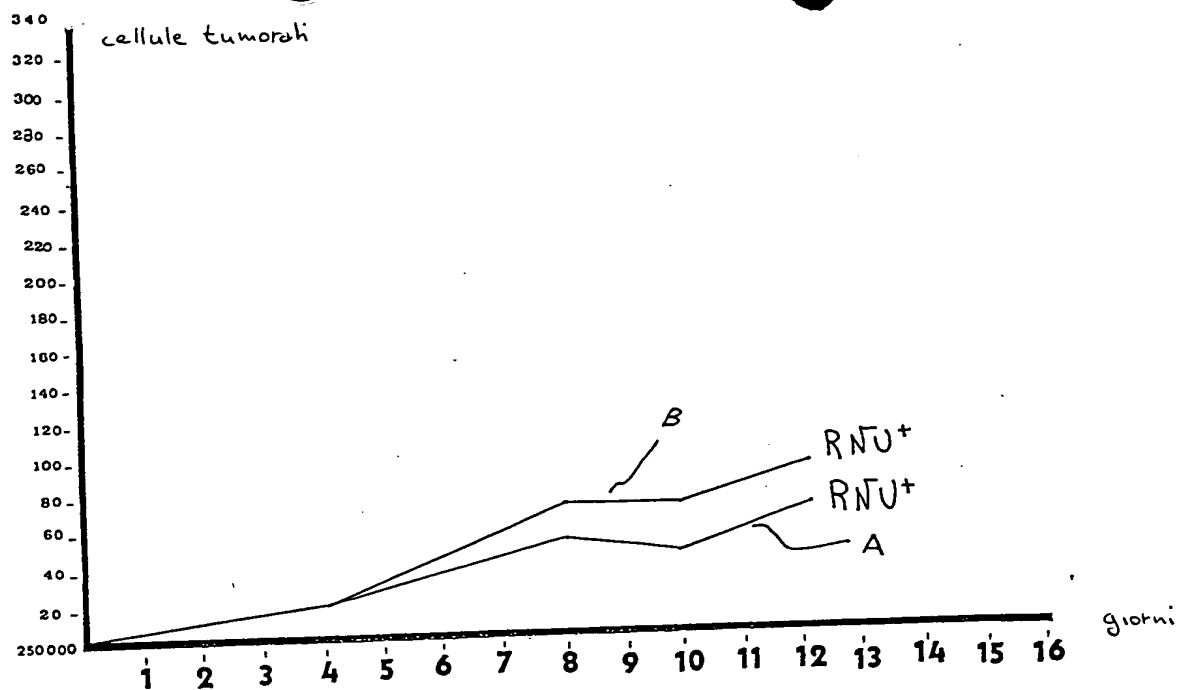


Fig. 5

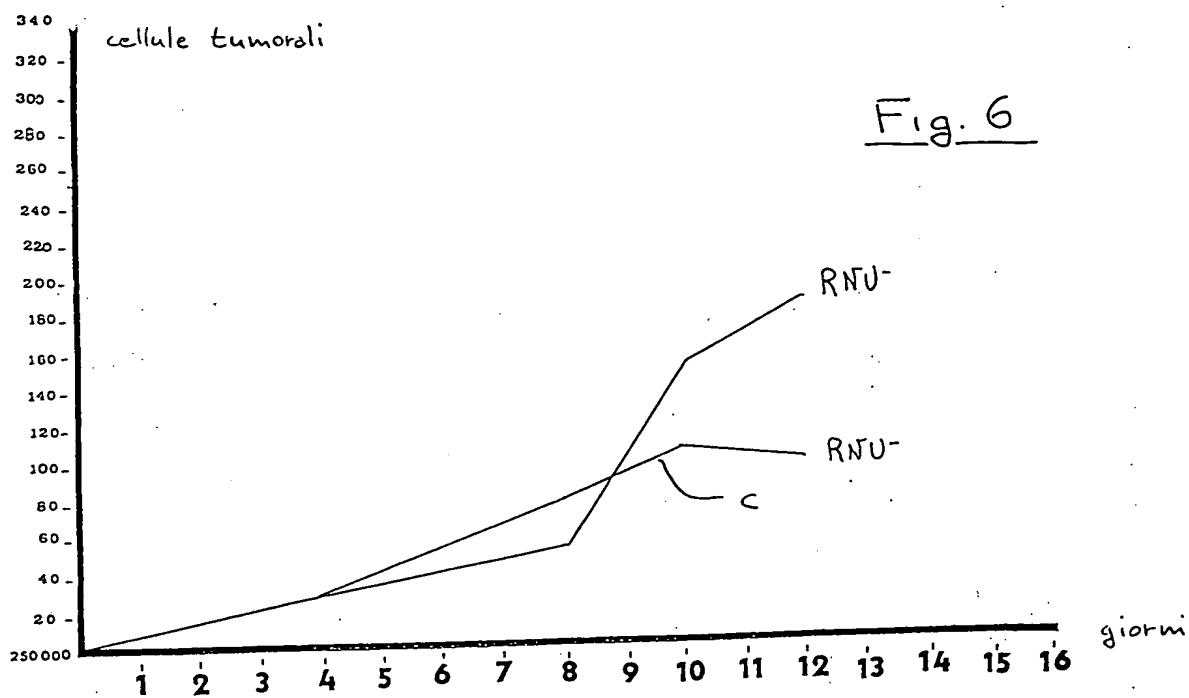


Fig. 6

Ing. G. Marietti (n. iscr. 175)  
 Dr. G. Giolli (n. iscr. 513)